ALYTES, 1993, 11 (2): 64-76

Efecto de la densidad poblacional en larvas de *Bufo arenarum* producido a traves de señales visuales

Leandro A. MIRANDA [1] & Armando PISANÓ [2]

Laboratorio de Investigaciones Embriológicas (LABINE), CONICET, Montevideo 126, 4 Piso, 1019 Buenos Aires, Argentina

This study deals with the effect of density on growth and metamorphosis in *Bufo arenarum* larvae. Mortality rates were independent of initial density. We concluded that increase in initial density has a negative effect on larval growth and on body mass at the metamorphic climax, and that it increases duration of metamorphosis. The "crowding" effects could be provoked by behavioural interactions mediated through visual cues, that we called "mass effect".

INTRODUCCIÓN

La tasa de crecimiento corporal en cada estadío del desarrollo representa una considerable parte en la estrategia adaptativa de cada especie (COLE, 1954). En los animales ectotermos estas tasas están controladas especialmente por las condiciones ambientales, siendo la temperatura una de las más importantes (SMITH-GILL & BERVEN, 1979). A su vez, en los animales acuáticos, el tamaño corporal y su crecimiento está relacionado con el volúmen de agua en la que se encuentran (ALLEE, 1931), y con otros factores como ser disponibilidad de alimento, competición intraespecífica e interespecífica, predación, etc.

La regulación de las poblaciones de anfibios se produce principalmente durante la etapa larvaria (WILBUR, 1980), ya que del éxito en superar los procesos metamórficos dependerá la abundancia de ejemplares adultos en la naturaleza.

La metamorfosis en los anuros involucra tanto el crecimiento corporal como la diferenciación de tejidos y órganos, siendo dificultoso separar ambos procesos. Varios autores (WILBUR & COLLINS, 1973; DASH & HOTA, 1980; MAHAPATRO & DASH, 1988) han indicado que las condiciones que afectan la tasa de crecimiento en las larvas de anuros también afectan el tiempo de la metamorfosis y el tamaño corporal al clímax metamórfico.

1. Becario del CONICET
2. Miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET.

Este tamaño corporal, al finalizar la metamorfosis, no sólo influirá en la supervivencia futura de los juveniles, sino también afectará el potencial reproductivo de los adultos (BERVEN, GILL & SMITH-GILL, 1979; SMITH, 1987; SEMLITSCH & CALDWELL, 1982; BERVEN, 1990).

Estudios realizados en larvas de diferentes especies de anuros han demostrado que el aumento de la densidad poblacional influye negativamente en el crecimiento y la metamorfosis, debido a competición por el alimento (BROCKELMAN, 1969, WILBUR, 1977a, 1982; DE BENEDICTIS, 1974), a interacciones comportamentales (GROMKO, MASON & SMITH-GILL, 1973; JOHN & FENSTER, 1975) o a factores inhibidores de naturaleza varia que se encontrarían en el agua (ROSE, 1960, 1965; RICHARDS, 1958; AKIN, 1966; CULLEY, MEYERS & DOUCETTE, 1977; COLLINS, 1979, STEINWASCHER & TRAVIS, 1983; POLLS PELAZ, 1987) En *Bufo stomaticus*, MAHAPATRO & DASH (1988) demostraron que elevadas densidades poblacionales reducen la tasa de crecimiento larval, mientras que aumentan los tiempos de metamorfosis.

En el presente trabajo, hemos considerado oportuno estudiar el efecto que podría provocar un aumento de la población inicial en el crecimiento corporal y la metamorfosis en larvas de *Bufo arenarum*. Paralelamente, hemos intentado verificar si el "efecto de masa", entendido como la sumatoria de las interacciones comportamentales percibidas a través de señales visuales, puede influir en forma significativa en el control hormonal del crecimiento y metamorfosis en larvas de la especie en estudio.

Bufo arenarum es un sapo de considerable tamaño, siendo los machos (largo hocico-cloaca: 88-108 mm) más pequeños que las hembras (largo hocico-cloaca. 93-112 mm). De amplia distribución en Sudamérica, es la especie más frecuente en el territorio argentino, extendiéndose desde la provincia de Jujuy hasta el Río Chubut cerca de las costas Patagónicas (CEI, 1980). De gran adaptabilidad, puede encontrárselo tanto en ambientes secos como húmedos, se reproduce en primavera-verano coincidiendo con los períodos lluviosos, y coloca sus huevos (4000-5000) en cordones gelatinosos en aguas quietas poco profundas (CEI, 1980). Su coloración es verdosa-amarronada en el dorso y amarillenta-blanquecina en el vientre. Los renacuajos poseen cuerpo deprimido y redondeado con pigmentación oscura

MATERIALES Y MÉTODOS

Larvas de *Bufo arenarum*, obtenidas en el laboratorio mediante fertilización in vitro y mantenidas según metodologías descritas (MIRANDA, PAZ & PISANÓ, 1991), seleccionadas al azar de una misma cohorte en el estadío I de MARTIN, NUÑES & TOMATIS (1985) (esbozos patas posteriores), equivalente al estadío 26 de GOSNER (1960), fueron acondicionadas en peceras de 2 l de volumen.

Se realizaron dos ensayos, uno para demostrar el efecto del aumento de las densidades en el crecimiento y metamorfosis larval, y otro para demostrar la existencia de algún factor comportamental percibido visualmente (definido como "efecto de masa") que podría influir en estos parámetros·

- Ensayo 1. - Grupo A: 5 larvas por litro. Grupo B: 10 larvas por litro. Grupo C: 20 larvas por litro. Grupo D: 40 larvas por litro.

- Ensayo 2. - Grupo E: se mantuvieron 10 larvas (sobre las que se efectuaron las mediciones) en un acuario de vidrio estanco, transparente, con un volumen de 2 l, a su vez introducido en un acuario de 5 l de volumen con 80 larvas (simulando una mayor densidad). Grupo F (grupo control): consistió en un acuario de 2 l de volumen con 10 larvas.

Tanto para el ensayo 1 como para el ensayo 2 se mantuvieron las mismas condiciones de cría. La temperatura osciló entre los 19-20°C, el fotoperíodo suministrado fué de 12 L : 12 O, el alimento ofrecido consistió en lechuga hervida ad libitum, los acuarios recibían oxígeno mediante aireadores, y el medio de cultivo (solución de Holtfreter: 3,5 g NaCl + 0,05 g KCl + 0,1 g $CaCl_2$ + 0,2 g $NaHCO_3$ + 1000 ml agua destilada) era renovado en su totalidad en días alternos.

De acuerdo con McNab (1970), Bartholomew (1977) y Hota & Dash (1987), se eligió al peso húmedo corporal como el mejor estimador del crecimiento corporal larval. El peso húmedo se determinó en una balanza electrónica con una sensibilidad de 0,001 g, y fué pesada la totalidad de los individuos de cada acuario, luego se obtuvo la media aritmética de ese valor.

Los ensayos concluyeron cuando todas las larvas habían completado su metamorfosis. Diariamente se retiraban los ejemplares muertos registrándose estos valores para establecer las tasas de mortalidad y también se retiraban los metamorfoseados (definidos como las larvas que poseían por lo menos un miembro anterior expuesto).

Los ensayos fueron realizados por triplicado y la media de cada una de las replicas de cada tratamiento fueron empleadas como los datos del análisis de varianza.

Resultados

En todos los grupos, tanto para el ensayo 1 como para el ensayo 2, se obtuvieron tasas de mortalidad que oscilaron entre el 15 y 20 %, lo que demostró su independencia de las densidades iniciales. Las curvas obtenidas a partir de los datos medidos en los grupos del ensayo 1, a través de las 18 semanas que duró el experimento (semana en la que todos las larvas habían completado la metamorfosis), mostraron diferencias para cada grupo en el crecimiento larval (fig. 1). El análisis de varianza de los valores medios de peso húmedo obtenidos para las primeras 7 semanas mostró que el aumento de la densidad inicial tiene un efecto negativo significativo ($P < 0{,}01$) en el crecimiento larval (Tabla I)

El peso húmedo obtenido al clímax metamórfico (fig. 2) para todos los grupos del ensayo 1 mostró diferencias significativas ($P < 0{,}01$) que disminuían si aumentaba la densidad (Tabla II). En cuanto al tiempo que tardó cada grupo en completar la metamorfosis, se observaron diferencias significativas ($P < 0{,}01$) (Tabla III) que aumentaban si las densidades iniciales eran mayores (fig. 3). Wilbur & Collins (1973), Dash & Hota (1980) y Mishra & Dash (1984) sugieren que el clímax metamórfico se

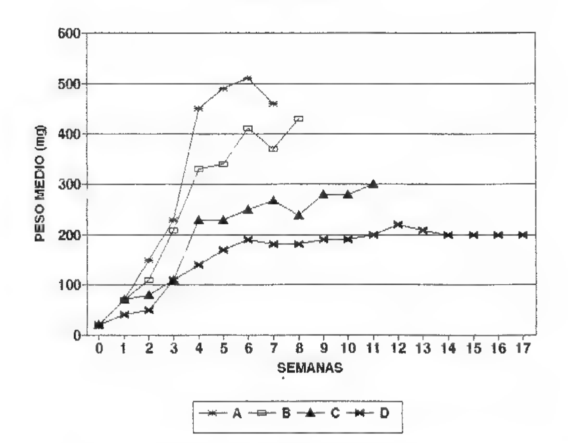


Fig. 1. — Crecimiento dependiente de la densidad inicial en larvas de *Bufo arenarum*. A. 5 larvas por litro. B· 10 larvas por litro C: 20 larvas por litro. D: 40 larvas por litro.

Tabla I. — Análisis de varianza doble del peso (mg) de larvas de *Bufo arenarum* en función de la densidad inicial. Los valores analizados son las medias de las 3 réplicas de los grupos del ensayo 1 tomados en las 7 primeras semanas.

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	MC	F	P
Subgrupos	31	2.145.776	69.219		
Densidad	3	536.972	178.990	53,9	<0,01
Semanas	7	1.377.985	196.885	59,3	<0,01
Interacción	21	230.819	10.991	3,3	<0,01
Error	64	212.372	3.318		
Total	95	8.148			

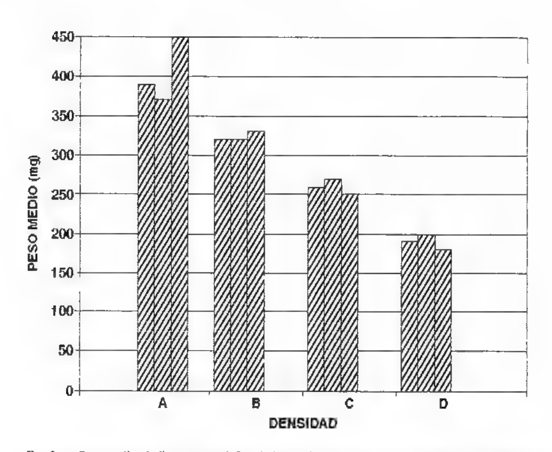


Fig. 2. Peso medio al clímax metamórfico de larvas de *Bufo arenarum* en función de la densidad inicial. Se grafican los valores medios de las réplicas por grupo.

Tabla II. – Análisis de varianza del peso (mg) al clímax metamórfico de larvas de *Bufo arenarum* en función de la densidad inicial.

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	MC	F	P
Densidad	3	74.358,4	24.786,13	50,41	<0,01
Error	8	3393,3	491,66		
Total	11	78.291,7			

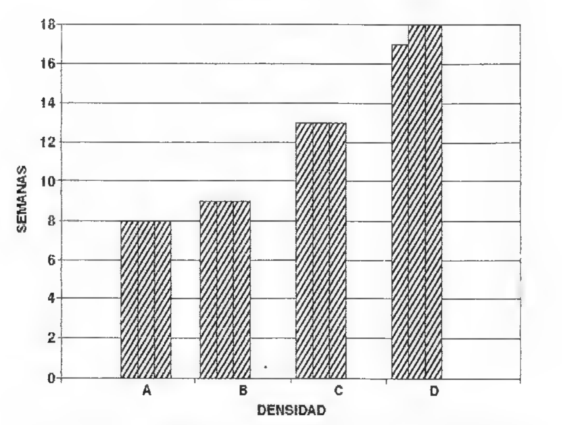


Fig. 3 – Tiempo (en semanas) en completar la metamorfosis en larvas de *Bufo arenarum* en función de la densidad inicial. Se grafican los valores medios de las réplicas por grupo.

Tabla III. – Análisis de varianza del tiempo (en semanas) en completar la metamorfosis en larvas de *Bufo arenarum* en función de la densidad inicial.

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	MC	F	P
Densidad	3	174,25	58,0833	667,6	<0,01
Error	8	0,67	0,8750		
Total	11				

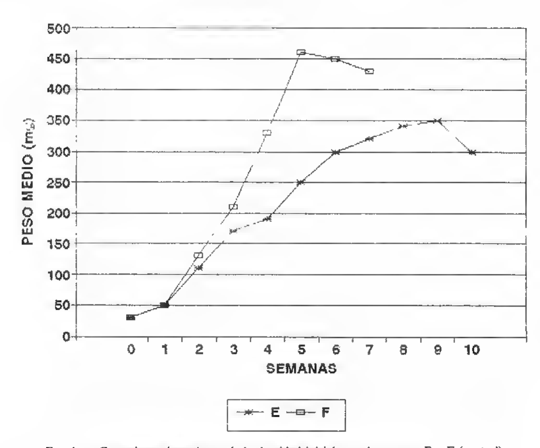


Fig. 4 – Crecimiento dependiente de la densidad inicial para los grupos E y F (control).

Tabla IV – Análisis de varianza del peso en (mg) de larvas de *Bufo arenarum* para los grupos E y F (control). Los valores analizados son las medias de las 3 réplicas tomados en las 7 primeras semanas.

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	MC	F	P
Subgrupos	15	1.044.498	69.219		
Tratamientos	1	35.752	35.752	40,1	<0,01
Semanas	7	980.481	140.060	157	<0,01
Interacción	7	28.265	4.038	4,5	<0,01
Error	32	28.535	892		
Total	15				

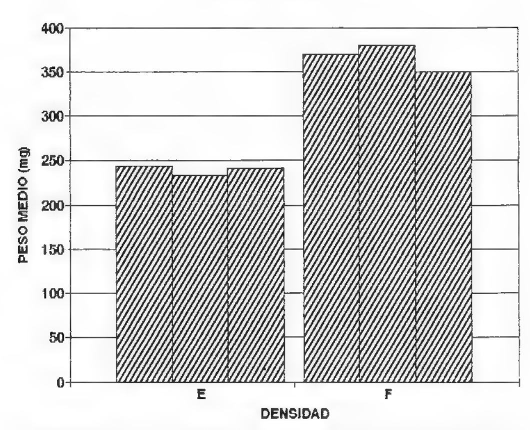


Fig. 5 Peso medio al clímax metamórfico para las larvas de los grupos E y F (control). Se grafican los valores medios de las réplicas por grupo.

Tabla V – Análisis de varianza del peso (mg) al clímax metamórfico de larvas de *Bufo arenarum* para los grupos E y F (control).

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	MC	F	P
Tratamientos	1	7.210,66	7.210,66	26,97	<0,01
Error	4	534,67	267,33		
Total	5	7.745,33			

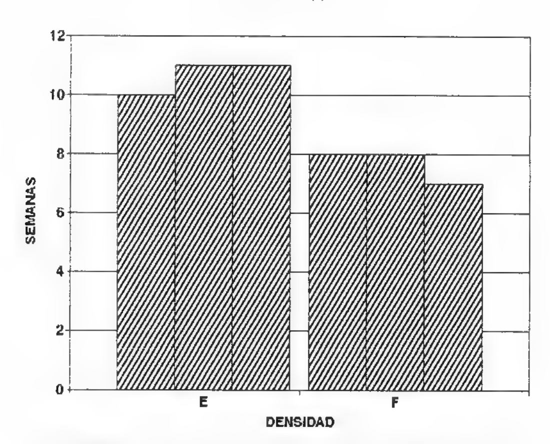


Fig 6 Tiempo (en semanas) en completar la metamorfosis para las larvas de los grupos E y F (control). Se grafican los valores medios de las réplicas por grupo.

Tabla VI. — Análisis de varianza del tiempo (en semanas) en completar la metamorfosis en larvas de *Bufo arenarum* para los grupos E y F (control).

Fuente de variación	Grados de libertad	SC	MC	F	P
Tratamientos	1	16,67	16,67	50,51	<0,01
Error	4	1,33	0,33		
Total	5	18			

inicia después de que las larvas llegan a un peso corporal mínimo. En nuestro ensayo el peso mínimo observado fue de 180 mg (grupo D) y el máximo 450 mg (grupo A) (fig. 2). En cuanto al tiempo en completar la metamorfosis, se obtuvo un mínimo de 8 semanas (grupo A) y un máximo de 18 semanas (grupo D) (fig. 3).

Las curvas obtenidas con los valores medidos en los grupos del ensayo 2 mostraron diferencias en el crecimiento, registrándose valores mayores en el grupo F (control) (fig. 4). Los pesos medios de las primeras 7 semanas del experimento, sometidos a análisis de varianza, mostraron diferencias significativas ($P < 0,01$) (Tabla IV). El peso húmedo de los ejemplares al clímax metamórfico mostró diferencias significativas ($P < 0,01$) (Tabla V), registrándose valores menores en el grupo E (fig. 5). En cuanto al tiempo empleado en la metamorfosis, se observó que fué mayor en el grupo E (fig. 6), y los datos entre ambos grupos mostraron diferencias significativas ($P < 0,01$) (Tabla VI).

DISCUSIÓN

El presente estudio pone en evidencia que, para larvas de *Bufo arenarum*, el crecimiento corporal depende de la densidad poblacional y no sólo se refleja en el peso con el que los ejemplares llegan al clímax metamórfico, sino también en el tiempo que emplean en superar la metamorfosis.

El efecto negativo de la densidad en el crecimiento y metamorfosis ha sido atribuído, por lo menos en algunos casos, a la producción de una sustancia peculiar producida por los renacuajos de mayor tamaño que inhibirían el crecimiento de los más pequeños de la población (RICHARDS, 1958; ROSE, 1960; LICHT, 1967), así también a la competición por el recurso alimenticio en función de las más elevadas densidades (WILBUR & COLLINS, 1973; DASH & HOTA, 1980; SOARES et al., 1983, TRAVIS, 1984; MAHAPATRO & DASH, 1988)

En cuanto a la duración del tiempo de metamorfosis y el tamaño de los ejemplares al completarla, nuestros resultados corroboran los estudios realizados en laboratorio y en el campo en *Rana catesbeiana* (ROSE, 1960; AKIN, 1966; LICHT, 1967, COLLINS, 1979), y por MAHAPATRO & DASH (1988) en *Bufo stomaticus*. Sin embargo algunos autores han observado que un incremento de interacciones sociales en larvas de *Bufo americanus* tendría un efecto positivo sobre el peso al clímax metamórfico (WILBUR, 1977b; BREDEN & KELLY, 1982).

Los resultados obtenidos, tanto en el ensayo 1 como en el 2, señalan que ciertas interacciones comportamentales influirían negativamente en el crecimiento y desarrollo larval. En nuestro estudio hemos denominado "efecto de masa" a la sumatoria de las interacciones comportamentales observadas (como ser choques entre ejemplares, efectos visuales, etc) u otras, que se traducirían en una respuesta estresante en las larvas con el consiguiente efecto negativo en el crecimiento y desarrollo larval. Este "efecto de masa" sería mayor en función de densidades más elevadas y como se desprende de los resultados del ensayo 2, los estímulos debidos a la presencia de otros ejemplares serían captados visualmente por las larvas. Estos resultados corroboran en parte observaciones realizadas por GROMKO, MASON & SMITH-GILL (1973) y JOHN & FENSTER (1975), quienes han emitido

la hipótesis que interacciones comportamentales en larvas de anuros, y su influencia en el control hormonal del crecimiento y desarrollo, estarían relacionados directamente con el efecto que proporcionan elevadas densidades poblacionales.

Larsen et al. (1990) han estudiado el efecto de la densidad como posible causa de estrés en ejemplares adultos de *Bufo bufo*, observando un crecimiento menor y un comportamiento agresivo de los ejemplares mantenidos a densidades más elevadas. Sin embargo hasta el momento en larvas de anuros no se habían realizado estudios al respecto.

Si bien nuestros resultados parecen ser coherentes, es necesario confirmar la hipótesis enunciada con análisis a nivel hormonal, en modo especial sería conveniente un estudio comparativo de las concentraciones de corticosterona en sangre entre los distintos grupos experimentales que, como ha sido probado en otras especies (Elsey et al. 1990), representan un parámetro importante para cuantificar, de alguna forma, el efecto estresante causado por la densidad.

Resumen

Se ha estudiado el efecto de la densidad en el crecimiento corporal y metamorfosis de larvas de *Bufo arenarum* en condiciones controladas de laboratorio. Las tasas de mortalidad observadas fueron independientes de las densidades iniciales Se señala que el aumento de la densidad afecta negativamente el crecimiento corporal larval como así también el tamaño al clímax metamórfico y alarga el tiempo de la metamorfosis Los efectos negativos productos del aumento de las densidades larvales iniciales podrían deberse a interacciones comportamentales que hemos denominado "efecto de masa", y que percibidas visualmente influirían en el control hormonal del crecimiento y metamorfosis

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado utilizando aportes financieros del CONICET (Pid. 3004800/88).

Literatura citada

Akin, G. C., 1966 Self-inhibition of growth in *Rana pipiens* tadpoles. *Physiol Zool*, **39**: 341-356.
Allee, C., 1931. — *Animal aggregation*. Chicago, Univ. Chicago Press.
Bartholomew, G A, 1977 — Energy metabolism. *In*: M. C. Gordon (ed), *Animal physiology principle and adaptation*, 3rd ed., New York, Mac Millan.
Berven, K A, 1990. — Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Ecology*, **71**: 1599-1608.
Berven, K. A., Gill, D. E. & Smith-Gill, S. J, 1979. — Counter gradient selection in the green frog, *Rana clamitans*. *Evolution*, **33**: 609-623
Breden, F & Kelly, C H., 1982 — The effect of conspecific interactions on metamorphosis in *Bufo americanus*. *Ecology*, **63** 1682-1689.

BROCKELMAN, W. Y., 1969. — An analysis of density effects and predation of *Bufo americanus* tadpoles. *Ecology*, **50**: 632-644.

CEI, J. M., 1980. — Amphibians of Argentina. *Monit. zool. ital.*, (n. s.), Monogr. **2**: i-xii + 1-609.

COLE, I. C., 1954. — The population consequences of life history phenomena. *Quart. Rev. Biol.*, **29**: 103-107.

COLLINS, J. P., 1979. — Intrapopulation variation in the body size at metamorphosis and timing of metamorphosis in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Ecology*, **60**: 738-749.

CULLEY, D. D., Jr., MEYERS, S. P. & DOUCETTE, A. J, Jr., 1977. — A high density rearing system for larval anurans. *Lab. Animal*, **6**: 34-41.

DASH, M. C. & HOTA, A. K., 1980. — Density effects on the survival, growth and metamorphosis of *Rana tigrina* tadpoles. *Ecology*, **61**: 1025-1028.

DE BENEDICTIS, P. A., 1974. — Interspecific competition between tadpoles of *Rana pipiens* and *Rana sylvatica*: an experimental field study. *Ecol. Monogr.*, **44**: 129-151.

ELSEY, R. M., JOANEN, T., MCNELSE, L. & LONSE, V., 1990. — Growth rate and plasma corticosterone levels in juvenile alligators maintained at different stocking densities. *J. exp. Zool.*, **255**: 30-36.

GOSNER, K., 1960. — A simplified table for staging anurans embryos and larvae with notes on identifications. *Herpetologica*, **16**: 183-190.

GROMKO, M. H., MASON, F. S. & SMITH-GILL, S. J., 1973. — Analysis of the crowding effects in *Rana pipiens* tadpoles. *J. exp. Zool.*, **186**: 63-76.

HOTA, A. K. & DASH, M. C., 1987. — Growth and metamorphosis of anuran larvae: effect of diet and temperature. *Alytes*, **5**: 165-172.

JOHN, K. R. & FENSTER, D., 1975. — The effects of partitions on the growth rate of crowded *Rana pipiens* tadpoles. *Amer. Midl. Nat.*, **93**: 123-130.

LARSEN, L. O., CHRISTIANSEN, M. B., TERKEL, D., HASTRUP, S., KAPEL, C., SCIUTO, M. & WULFF, A. M., 1990. — Crowding in toads, are crowded toads stressed or not? *In*: W. HANKE (ed.), *Biology and physiology of amphibians*, Stuttgart & New York, Gustav Fischer Verlag: 271-277.

LICHT, L. E., 1967. — Growth inhibition in crowded tadpoles: intraspecific and interspecific effects. *Ecology*, **48**: 736-745.

MAHAPATRO, B. K. & DASH, M. C., 1988. — Density effect on growth and metamorphosis of *Bufo stomaticus* larvae. *Alytes*, **6**: 88-98.

MARTIN, M. C., NUÑES, A. M. & TOMATIS, M. E., 1985. — Metamorfosis en anfibios. I. Desarrollo metamórfico en larvas de *Bufo arenarum* Hensel (Amphibia: Anura). *Hist. Nat.*, **5**: 289-302.

MCNAB, B. K., 1970. — Body weight and energetics of temperature regulation. *J. exp. Biol.*, **53**: 329-348.

MIRANDA, L. A., PAZ, D. A. & PISANÓ, A., 1991. — Efecto de la actividad tiroidea en la tolerancia al frío de larvas de *Bufo arenarum*. *Rev. esp. Herpet.*, **6**: 55-60.

MISHRA, P. K. & DASH, M. C., 1984. — Metamorphosis of *Polypedates maculatus*: an analysis of crowding effect. *Alytes*, **3**: 163-167.

POLLS PELAZ, M., 1987. — On the identity of the so-called "algae like cells" in tadpole cultures of European green frogs (*Rana ridibunda*). *Alytes*, **6**: 23-26.

RICHARDS, C. M., 1958. — The control of tadpoles growth by alga-like cells. *Physiol. Zool.*, **35**: 285-296.

ROSE, S. M., 1960. — A feedback mechanism of growth control in tadpoles. *Ecology*, **41**: 88-98.

----- 1965. — The control of growth and reproduction in freshwater organisms by specific products. *Mitt. internat. Verein. Limnol.*, **13**: 21-35.

SEMLITSCH, R. D. & CALDWELL, J. P., 1982. — Effects of density on growth, metamorphosis, and survivorship in tadpoles of *Scaphiopus holbrooki*. *Ecology*, **63**: 905-911.

SMITH, D. C., 1987. — Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date of metamorphosis. *Amer. Nat.*, **68**: 344-350.

SMITH-GILL, S. J. & BERVEN, K. A., 1979. — Predicting amphibian metamorphosis. *Amer. Nat.*, **113**: 563-585.

SOARES, H., FONTANELLO, D., MANDELLI, H., REIS, J., PENTEADO, L. & CAMPOS, B., 1983. — Efeito da densidade de populacao no ganho de peso de girinos da Ra-Touro (*Rana catesbeiana*). *B. Inst. Pesca*, **10**: 47-51.

STEINWASCHER, K. & TRAVIS, J., 1983. — Influence of food quality and quantity on early larval growth of two anurans. *Copeia*, **1983**: 143-148.

TRAVIS, J., 1984. — Anuran size at metamorphosis: experimental test of a model based on intraspecific competition. *Ecology*, **65**: 1155-1160.

WILBUR, H. M., 1977a. — Density-dependent aspects of growth and metamorphosis in *Bufo americanus*. *Ecology*, **58**: 196-200.

----- 1977b. — Interactions of food level and population density in *Rana sylvatica*. *Ecology*, **58**: 206-209.

----- 1980. — Complex life cycles. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **11**: 67-93.

----- 1982. — Competition between tadpoles of *Hyla femoralis* and *Hyla gratiosa* in laboratory experiments. *Ecology*, **63**: 278-282.

WILBUR, H. M. & COLLINS, J. P., 1973. — Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science*, **182**: 1305-1314.

Corresponding editor: Ulrich SINSCH.

